

## 〈資料〉無塵無菌恒温装置の設計、製作と性能

片 山 吉 穂

### Preparing of Bio-Clean Room and Its Quality.

YOSHIHO KATAYAMA

昨年来本学部学舎増設工事がなされ、今夏完成した。今回の学舎増設に際して学部諸賢の御理解と御尽力によって食物学科栄養生理学第3研究室に無塵無菌恒温装置（Bio-clean room）が完成し、機能し始めている。無塵無菌恒温装置は細胞あるいは組織培養などのような医学的あるいは生物学的研究には欠かせない装置<sup>1,2)</sup>であるが、近年医薬品製造においては云うまでもなく半導体製造や電子、精密工業などの分野でも広く用いられるようになり、さらに食品の無菌包装法開発に伴って無塵無菌室の用途は多方面に広がりつつある。

そこで今回完成した本研究室の無塵無菌恒温装置の概要を述べ、合せて本装置について2, 3の物理的ならびに生物学的検査を行った。その成績から本装置の性能と今後の保守、管理などについて紹介し、参考に供し度く考える。

#### 使用目的及びそれに伴う製作条件

使用目的としては細胞、組織培養に際して必要となる無菌操作、具体的には無菌培養メディアム液の調整、培養細胞ならびに組織の生体からの無菌的剔出操作、植付け操作ならびに培養メディアム液の交換などである<sup>3)</sup>。今日の培養研究においては抗生物質が日常的に使用されている事が多いが、培養細胞などに及ぼす抗生物質の影響を考えると、これら抗生物質の使用は極力さける事が望ましいと考えられる。ここに無塵無菌恒温装置の必然性が生じるわけであり、また本装置を食品の無菌包装などの基礎的研究に応用する場合にも必要なことと思われる。

以上の使用目的に応じた製作条件としては1.無塵無菌である事、2.室の広さの問題（最低限2坪程度）、3.恒温の保持（ $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ）、4.予備室（前室）の設置による室外

からの汚染防止、5.二重ガラス装着窓の設置、6.断熱性壁面による気密性、保温性の確保、7.充分な送風能力、8.可及的静かな稼働、9.ランニングコストの低廉、10.使用し易い事、11.故障などの少い事などであるが、諸般の状況から室の広さの制限と予備室がなく、室外からの汚染防止の低下の為に全般的にClass 1000以下（勿論清浄空気吹出し口附近では米航空宇宙局規格Class 100を確保出来る事を条件とした）となった。この室外からの汚染を考慮して作業者の出入を可及的に少なくする為に物品の搬出搬入の為にPass box\*を取り付けた。また充分な循環空気量を確保する為の送風音が多少大きくなるのは止むを得なかった。

#### 装置の概要

本無塵無菌恒温装置（Bio-clean room）の概要は図-1に示してあるように、外寸、巾3600mm、奥行1800mm、面積6.48m<sup>2</sup>（約2坪）、高さ2100mmで、容積13.60m<sup>3</sup>である。前面には二重ガラス装着の窓（W）2面と出入口の扉（D）、Pass box（PB）及びセーフティーダンパー付排気孔（AE）とがあり、出入口のある反対側の一端の天井部にフィルターユニット（FU）が、他端（出入口に近い端）に室内空気の帰還口（F、2枚のフォレドンフィルター装着）、空調装置（AC）、送風装置（V）及び操作盤（CP）があつて、送風装置とフィルターユニットとの間が循環ダクト（CD）で連結されている。この循環ダクトの一部が少し広がっ

\*Pass boxは壁面にはめ込まれた内外二重の扉のある箱でそれらの扉の間の空間に搬入搬出物品を置いて室内へまた室外へ取り出すようになっている。またこれにはインターホーンが附属していて内外の連絡が出来るようになっている。

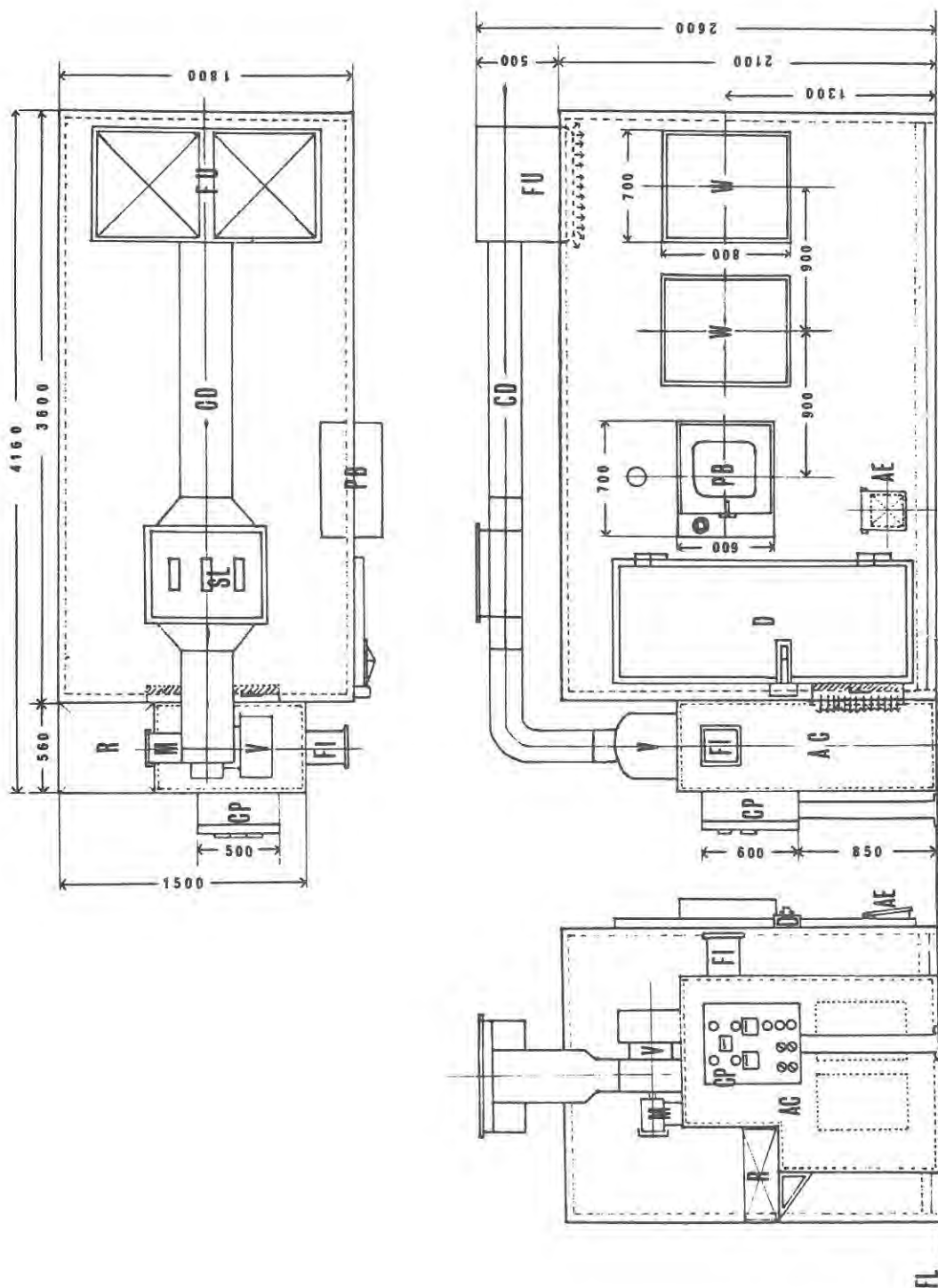


图 1 一般生物洁净室布局图



写真-1及び2 Inner view of bio-clean room.

ていてそこに殺菌燈(SL, 東芝殺菌燈GT-1010 NB10W, 3燈)が設置されている。

壁面、床及び天井部は昭和アルミニウム株式会社製のプレハブパネル(保温厚44mm)からなり、表面材は内外2枚のアルミニウム板で、そのアルミニウム板の間は注入発泡した硬質ポリウレタンフォームからなっている。メーカー指定法で各パネル間を接続し、その接続部は室内外面からシリコンシーラーを施し、室内からの空気のもれ及び室外からの汚染を防いでいる。

清浄空気吹出口はフィルターユニット直下にあつて、清浄空気は天井部から室内に入り室内を循環して他端(出入口に近い端)にある2枚のフレッドフィルターを通過して空調装置内に帰還する。

空調装置(AC)は1kWヒーター3ヶ及び冷却装置及び新鮮空気取入口(FI)からなり、常に室温 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ に自動的に調節されている。送風装置(V)はステンレス製ファンをモーター(M,  $4\text{P} \times 0.75\text{kW}$ )で駆動し毎分 $25\text{m}^3$ の送風能力と常に静水圧50mmになるように設計施行された。一方アブソリュートフィルターユニット(FU)にはケンブリッヂフィルター(CSU-34型, 2枚組1セット)を、冷凍機(R)は三洋電気株式会社製UF-835Lを使用し、これら各機

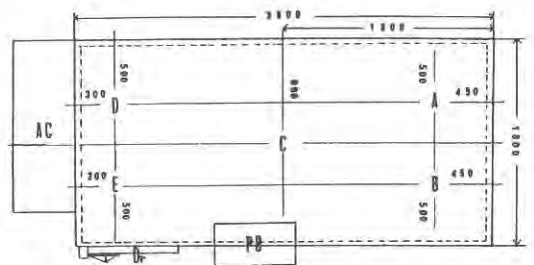


図-2 Tested positions for cleanness in bio-clean room.

器の調節制御を操作盤(CP)でまとめて行えるようになっている。操作盤にはOMRON社製暖房及び冷房用の2ヶの自働指示温度調節器(E5A-X3PT)と電流計及び主電源の電磁開閉器とヒーター回路、室内灯ならびに殺菌燈などのスイッチが装着されている。主電源は200V 30Aで、他に室内での使用の為に100V 20A及び100V 30Aの差込と2口栓の付いた都市ガスが配管してある。

空調装置で $20^\circ\text{C}$ に調節された空気が送風装置で循環ダクトに送られ、循環ダクトを通過中に殺菌燈で殺菌されて、フィルターユニットで塵埃が取除かれ無塵無菌空気となって室の天井部から室内に吹き込まれ、室内を循環清浄にし、一部分の空気はセーフティーダンパー付排気孔を経て室外に、大部分の空気はフレッドフィルター(F)を通過して空調装置内に帰還するようになっている。なお写真-1及び2は室内の様で写真-1は出入口に近い位置から主作業台及び清浄空気流入口を、写真-2は出入口附近の予備作業台を示している。これら写真の番号は後述する細菌学的検査の測定場所を示したもので作業台にはいずれもガラス製のケースが設置されている。

#### 検査成績ならびに考察

無塵無菌恒温室の清浄状態がどの程度に保たれているかを検査した成績を以下に述べる。

表-1 Cleanness in the bio-clean room measured with a particle counter(/ft<sup>3</sup>)

Particle size	Tested positions	1	2	3	4
0.5 $\mu$	A point	100>	100>	10	100>
	B //	100>	100>	10>	100>
	C //	100	100	—	100>
	D //	100	100	—	—
	E //	300	200	—	—
0.3 $\mu$	A //	200	100	20	100>
	B //	100	100	50	100>
	C //	900	500	—	100>
	D //	400	200	—	—
	E //	500	500	—	—

表-2 Time course of cleanness at point B of the bio-clean room after warming up of the apparatus.

Time (min.)	Particle count numbers (/ft <sup>3</sup> )
10	2000
11	1100
12	400
13	400
14	200
15	300
16	100>
17	300
18	300
19	200
20	100>
21	100>
22	100>

表-3 Recovery of cleanness at point E of the bio-clean room after opening the door for one minute.

Time (min.sec.)	Particle count numbers (/ft <sup>3</sup> )
0	183500
30	229800
1	134200
30	88700
2	63600
30	38500
3	32800
30	21200
4	14600
30	9100
5	6100
30	6200
6	4100
30	2200
7	1600
30	1300
8	900
30	900
9	1000
30	400
10	300
30	200
11	200

先ず無塵についてであるが、これは図-2のA, B, C, D及びEの室内5つの位置(いずれも床上90cm)にパーティクルカウンター(リオン株式会社製KC-01型)を設置して測定したものである。成績は表-1のように、A及びBが室の奥で主作業台付近の位置に当り、D及びEが入口に近い位置で予備作業台を置く位置である。Cは室のほぼ中央部であるが、 $0.5\mu$ 以上の微小粒子の累積量はA及びB位置では4回の測定ともに100個/ft<sup>3</sup>以下となっている。またC位置では100個/ft<sup>3</sup>あるいはそれ以下であるが、D及びE位置では300個/ft<sup>3</sup>以下であった。表には参考の為に $0.3\mu$ の微粒子の測定値も示されている。これらの成績から本室では出入口付近を除いた室の中央部よりも奥の部分では100個/ft<sup>3</sup>以下が保たれているものと推測される。次に本装置運転開始後室内の清浄度の時間的経過をしらべたもの(B位置で測定)で表-2には運転開始10分以後の成績が示されている。10分で2000個/ft<sup>3</sup>であったものが、その後2分で400個/ft<sup>3</sup>程度になり20分頃から100個/ft<sup>3</sup>以下になっている。この成績から装置を作働させてから20~30分後には室内の清浄度がNASA規格のClass 100(後述する)程度になっている事がわかる。さらに扉の開閉による室外からの汚染が何分位で清浄化されるかをしらべたものが表-3である。測定はEで行なわれ、扉を1分間開放して閉じた直後を0分とし30秒ごとに測定された。表からもわかるように0分で183500個/ft<sup>3</sup>、30秒後に増加し、1分後から急速に累積カウント数が減少し、8~9分で約1000個/ft<sup>3</sup>、10~11分で約200個/ft<sup>3</sup>となっていて開扉前の値にほぼもどっている。この成績から1分間の扉の開放後安全度を加味しても15~20分間でもとの清浄度を回復出来るものと推測される。以上のパーティクルカウンターでの測定によってほぼNASAの規格のClass 100程度の清浄度が保たれている事がわかったので細菌学的検索を行った。測定位置は写真-1及び2の①、②及び③の位置である。①は主作業台のガラスケースの内、②は同じガラスケースの上、③は予備作業台のガラスケースの内である。先ず装置作働開始後、室内の壁面、作業台ガラスケースのすべての内外面及び室の床面を70%アルコールを含ませた布で清拭した後、無菌衣、無菌帽、及びマスク(いずれもオートクレーブで消毒済のもの)を着用して室内に入り、入室後25分たってから測定を開始した。9cmの滅菌済血液寒天培地(日研生物血液研究所、綿羊血液添加血液寒天平板)を用意し、15分、30分、60分及び150分間培地のシャーレのふたを取除いて室内の空気に曝露した後、37°C孵卵器で24時間培養し、培地に発生したコロニーの種及び数を検索した。その成績が表-4に示されている。Controlは曝露しなかった培地で、室外とは



表-4 Colony count numbers on a 9cm blood agar plates which were exposed in the bio-clean room for various minutes.

Tested positions	Exposure times (min.)	Colony count numbers (/φ 9cm. Blood-Agar plate)	Species
①	15	0	
	30	0	
	60	0	
	150	0	
②	15	0	
	60	0	
	150	0	
③	15	0	
	30	2	Staphylococcus sp.2
	60	0	
	150	6	Staphylococcus sp.6
Control	0	0	
Outside of the clean room	15	9	Staphylococcus sp.7 Gram positive bacilli 2

Twenty-four hrs. incubation at 37°C.

bio-clean roomの設置された室において15分間曝露されたものである。①及び②の位置における15～150分の曝露では細菌のコロニーは全く認められず、③では15分及び60分で0、30分で2、150分で6であって主作業台附近では150分までの曝露でも落下細菌によるコロニーの発生は全く認められなかった。なお①で150分曝露した血液寒天培地を24～120時間に亘って37°Cで培養し、観察したがコロニーは全く認められなかった。

以上が本装置の概要及び検査成績の概略であるが、日本では現在未だbio-clean roomの清浄度に関する基準は定められていない(測定方法については日本工業規格JIS B9920が昭和50年5月に制定されている)ので米国の規格が多く準用されているのが現状である。ここには米航空宇宙局の規格NHB5340.2<sup>3)</sup>を表-5に示す。最良清浄度と

してbio-clean room class 100があり、これは粒子径0.5μ以上の微粒子が1 ft<sup>3</sup>中に100個以下、また落下微生物量として1 m<sup>2</sup>当り1週間で12900個と定められている。この規格と本装置で測定された成績とを比べると累積微粒子数ではほぼClass 100をみたすものと考えられる。また落下微生物量では規格から直径9 cmの血液寒天培地当りに換算すると150分曝露で1個以下となる。曝露時間を単純計算で短縮するには問題が残るとしてもほぼNASAの規格に適合するものと推測される。しかし扉の開閉による汚染及び作業員自身からの発塵については問題があるのでこれらbio-clean roomの保守管理について述べる。

上記規格に適合し可及的高度な清浄度を保持するためには①二重扉あるいは無菌空気シャワーなどの設置による室外からの塵埃の移入を防止する。これは今直ちに行う事は無理であるが将来の問題として肝要であると考ええる。その間作業員の準備を万全にしbio-clean roomへの出入りの回数を出来る限り少くし、また機材などの持ち込みにはpass boxを充分に利用する。②作業員の服装なども無菌衣、無菌帽及びマスクの着用を励行し、履物を交換する。③無塵洗浄空気の通風量の調節及びケンブリッジフィルターの耐用年数の問題、構造機能において記述したように毎分25m<sup>3</sup>の清浄空気を流入させる能力があるが、現在これを½に調節している。これはフィルターユニットのケンブリッジフィルターの耐用年数とも関連する問題で通風量を増すと耐用年数は短縮する。現在の通風量を13m<sup>3</sup>/minとしてbio-clean roomの内容積12.96 m<sup>3</sup>を10倍量の清浄空気で洗いがすと仮定すると約10分間を要する事になり先述のパーティクルカウンターの測定成績とほぼ一致する。

## 要 約

本研究室に設置された無塵無菌恒温装置の概要を紹介した。また本室の清浄度についての物理的及び生物学的検査の成績からNASAのbio-clean room規格NHB-5340.2のClass 100をほぼみたす事がわかった。なお本室の保守管理についても考察した。

本装置設置に当り学舎増設委員長上林博雄教授始め学部諸賢の御理解、御尽力に、また細菌学的検査について京都府立医科大学中央検査部水谷昭夫講師の御協力に対し深く感謝致します。

表-5 NASA standard NHB 5340.2 for the bio-clean room.<sup>3)</sup>

Class of Bio-clean room	Suspended Particles		Microorganisms	
	Diameter (μ)	Cumulative particle count numbers /ft <sup>3</sup> (/l)	Suspended /ft <sup>3</sup> (/l)	fall down /Ft <sup>2</sup> W (m <sup>2</sup> ·W)
100	0.5<	100> (3.5>)	0.1 (0.0035)	1,200 (12,900)
10,000	0.5<	10,000> (350>)	0.5 (0.0176)	6,000 (64,600)
	5.0<	65> (2.3>)		
100,000	0.5<	100,000> (3,500>)	2.5 (0.0884)	30,000 (323,000)
	5.0<	700> (25>)		

文 献

- 1) 勝田甫：組織培養法，納谷書店，東京p3~46(1955)
- 2) Willmer,E.N.(editor)：Cells and tissues in culture. Methods, biology and physiology. Academic Press, London, pp373~446 (1965)
- 3) Homer F. Newell：NASA Standard for clean

rooms and work stations for the microbially controlled enviroment.(NHB 5340.2)；福山博之，斉藤恵一，遠山精一，興津賢一訳：微生物的制御された環境のクリーンルームおよび清浄作業台の規格，空気清浄17，(1) 2~16 (1979)

(昭和57年11月9日受理)

Summary

The outline of the bio-clean room in our laboratory was represented here. From the results of the determination of cumulative counts of suspended particles in our bio-clean room and bacteriological determinations, cleanness of our bio-clean room corresponded to Class 100 of the NASA standard NHB 5340.2. The maintenance and management for the bio-clean room were discussed.